



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ CH 667 673 A5

⑤① Int. Cl.: C 12 P 1/02
C 12 N 9/00

// (C 12 P 1/02, C 12 R 1:645)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 214/88

㉔ Anmeldungsdatum: 22.01.1988

㉔ Patent erteilt: 31.10.1988

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.10.1988

㉗ Inhaber:
Schweizerische Eidgenossenschaft, ETH, Institut
für Biotechnologie, Zürich

㉗ Erfinder:
Janshekar, Hossein, Zürich
Fiechter, Armin, Prof. Dr., Rudolfstetten

⑤④ Verfahren zur Herstellung von lignolytischen Brühen.

⑤⑦ Es wird ein einstufiges Verfahren zur biologischen Herstellung von lignolytischen Brühen beschrieben, wobei die Herstellung in technisch einfacher Weise erfolgt. Bei diesem Verfahren werden Basidiomyceten aus der Gruppe der Rost- und/oder Brandpilze in einem wässrigen Kulturmedium gezüchtet; es wird in Submerskultur in gerührten Bioreaktoren unter aeroben Bedingungen gearbeitet; das Kulturmedium hat eine zur Wachstumsbegrenzung durch mindestens einfache Limitierung essentieller Wachstumsstoffe geeignete Zusammensetzung und eine oder mehrere zellwandstabilisierende Substanzen; dabei wird eine lignolytische Brühe gebildet, die direkt für verschiedene technische und/oder kommerzielle Anwendungen eingesetzt werden kann, oder für die Herstellung eines Enzympräparates mit lignolytischen Eigenschaften weiterverarbeitet werden kann.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von lignolytischen Brühen durch Kultivierung von Basidiomyceten in einem für das Wachstum der Pilze geeigneten wässrigen Kulturmedium unter Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen, gekennzeichnet durch

- a) Züchten eines Basidiomyceten aus der Gruppe der Rost- und/oder Brandpilze,
- b) in einem Rührkessel unter aeroben Bedingungen,
- c) wobei das Kulturmedium eine zur Wachstumsbegrenzung durch eine oder mehrere Limitierungen essentieller Wachstumsstoffe geeignete Zusammensetzung aufweist und eine oder mehrere zellwandstabilisierende Substanzen enthält,
- d) bis zur Bildung der lignolytischen Aktivität in der Brühe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Rost- und/oder Brandpilze solche der Gattung *Fusarium*, z. B. *Phanerochaete chrysosporium* verwendet werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Kohlenstoff der wachstumsbegrenzende Stoff des Mediums ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Polypropylenglycol enthält.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Polyethylenglycol enthält.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Kohlenwasserstoffe enthält.

7. Lignolytisch aktive Brühe, hergestellt nach dem Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Ligninperoxidase enthält und imstande ist, zugegebenes Remazolblau zu entfärben oder Lignin abzubauen.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von lignolytischen Brühen auf biochemischem Weg. Derart hergestellte Brühen haben Bedeutung im Abbau von Ligninen in ligninhaltigen Substanzen, wie Kraftlignine oder Lignosulfat, sowie im Abbau persistenter Schadstoffe wie DDT, Benzpyren, Dioxin, Chlorphenol und dergleichen. Diese Kulturen eignen sich für künftige Anwendungen im Umweltschutz und für die Entsorgungsprobleme der industriellen und öffentlichen Bereiche.

Es sind Verfahrensarten bekannt geworden, welche als produzierende Spezies Weissfäulepilze verwenden. Diese Verfahren sind:

- Nichtgerührte, flache Kulturen in 125-ml-Flaschen mit 10-ml-Kulturinhalte. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Jäger, A., Croan, S. und Kirk, T.K. (1985) *Appl. Microbiol.* 50, 1274-1278 verwiesen.

- Geschüttelte Kulturen in 125-ml-, 1-l- und 2-l-Flaschen mit 10- bis zu 100-ml-Mediumsinhalt auf Rotationsschüttlern unter Sauerstoffeinwirkung. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichungen von Asther, M., Corrieu, G., Drapron, R. und Odier, E. (1987) *Enzym Microb. Technol.* 9, 245-249 und von Jäger, A., Croan, S. und Kirk, T.K. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1274-1278 verwiesen.

- Myzelkulturen in einem nichtgerührten vertikalen oder horizontalen Reaktor mit fortlaufender Zuführung von Sauerstoff. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Linko, Y.Y., Leisola, M., Lindholm, N., Troller, J., Linko, P. und Fiechter, A. (1986) *J. Biotechnol.* 4, 283-291 verwiesen.

- Bewegte Oberflächenverfahren oder Trommelreaktoren. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. und Farrel, R.L. (1986) *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27-32 verwiesen.

- Immobilisierte Myzelkulturen in 250-ml-Flaschen z. T. ohne Bewegung und unter Sauerstoffeinwirkung. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Linko, Y.Y., Leisola, M., Lindholm, N., Troller, J., Linko, P. und Fiechter, A. (1986) *J. Biotechnol.* 4, 283-291 verwiesen.

- Oberflächenkulturen auf Silikonschlauch in einem gerührten Reaktor unter Sauerstoffeinwirkung. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Willershausen, H., Graf, H. und Jäger, A. (1987) in «Lignin enzymic and microbial degradation» les Colloques de l'INRA, Nr. 40, Seiten 203-207, Ed. INRA, Paris, verwiesen.

Die Nachteile an den bekannten Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von lignolytischer Brühe sind:

- Die lignolytische Eigenschaft der Brühe wird durch biologische Aktivität der Mikroorganismen hervorgerufen. Für eine gute Produktion ist es daher wichtig, dass alle Mikroorganismen der Kultur ständig mit Nährlösung versorgt werden und die Kultivationsparameter (pH, Temperatur usw.) kontrolliert werden. Im Oberflächenverfahren wird nur ein Teil der Mikroorganismen, die sich auf der Kulturfläche befinden, versorgt. Die äusserste Kulturschicht bleibt inaktiv und nicht produktiv.

- Die Produktivität eines Oberflächenverfahrens ist abhängig von der vorhandenen Oberfläche. Im industriellen Prozess ergeben sich daraus Platzprobleme.

- Bei der Anwendung von immobilisierten Zellen zur Herstellung von lignolytischer Brühe müssen die verwendeten Trägermaterialien nach der Produktionsphase von der Brühe getrennt und evtl. zur Wiederverwertung gereinigt werden.
- Die zusätzliche Behandlung der Brühe wirkt sich im grosstechnischen Massstab nachteilig auf die Wirtschaftlichkeit dieses Prozesses aus.

Keines der bekannten Verfahren ist für die technischen bzw. grosstechnischen Betriebe geeignet. Ziel der Erfindung ist es daher, ein Verfahren für die kommerzielle Produktion von lignolytischen Brühen anzugeben, wobei die Herstellung und Aufarbeitung der Reaktionslösung technisch einfach gestaltet sein soll.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Lösungen mit hoher lignolytischer Aktivität in einem technisch einfachen Verfahren herzustellen. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss gelöst durch ein Verfahren mit den in Anspruch 1 angegebenen Merkmalen. Die bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemässen Verfahren haben die in den Ansprüchen 2 bis 6 angegebenen Merkmale.

Überraschenderweise und entgegen den Lehren des Standes der Technik wurde festgestellt, dass *Phanerochaete chrysosporium* auch im Rührkesseln lignolytische Aktivität zeigt, wenn bestimmte Bedingungen erfüllt sind. Die gerührten Submerssysteme sind besonders geeignet für den grosstechnischen Einsatz, da die Homogenität innerhalb des Kultivationsgefässes besser gewährleistet ist als beim Oberflächenverfahren oder bei immobilisierten Zellen. Die Masstabvergrößerung und die Kontrolle der Kultivations-/Produktionsparametern sind im Falle des gerührten Kessels einfacher. Die Anwendung von nichtträgergebundenen und freien Mikroorganismen ermöglicht die direkte Verwendung oder Weiterverarbeitung der produzierten Brühe.

Die Taxonomie der erfindungsgemäss geeigneten Basidiomyceten ist nicht abgeschlossen, und unter die Bezeichnung «Weissfäulepilze» oder «white-red fungi» fallen vermutlich auch unterschiedliche Gattungen der Rost- und/oder Brandpilze, z. B. *Fusarium*; für das erfindungsgemässe Verfahren

haben sich insbesondere die bereits beschriebenen Weissfäulepilze *Phanerochaete chrysosporium* und *Coriolus versicolor* als brauchbar erwiesen.

Rost- und/oder Brandpilze, insbesondere *Phanerochaete chrysosporium*, sind bei Züchtungen in geeigneten Medien und unter geeigneten Bedingungen zur Bildung von lignolytischen Lösungen befähigt. Für die lignolytischen Eigenschaften der Brühe sind verschiedene Enzyme, wie Ligninperoxidase (Ligninase), Manganperoxidase und Laccase, verantwortlich. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Kirk, T.K. (1987) Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 321, 461–474 verwiesen. Die vollständige Identifikation der beteiligten Enzyme und deren Zusammensetzung und Regulation sind noch nicht abgeschlossen.

Die durch erfindungsgemässes Verfahren hergestellte Brühe ist gekennzeichnet durch die in Anspruch 7 genannten Merkmale. Die Brühe wird lignolytisch aktiv, wenn ein oder mehrere der in Anspruch 7 genannten Bedingungen erfüllt werden, nämlich:

- Nachweis von Ligninperoxidase im Kulturfiltrat. Die Bestimmung der Ligninase erfolgt nach dem Verfahren, das von Tien, M. und Kirk, T.K. (1984) im Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 2280–2284 beschrieben ist.

- Entfärbung von «Remazol brilliant blue R dye». Nach Zugabe von z.B. 3 mg l⁻¹ dieses Farbstoffes färbt sich die Brühe blau. Wenn die Kultur nun aktiv wird, verschwindet diese Färbung.

- Abbau von Lignin. Zugabe von z.B. 100 mg l⁻¹ eines Lignins (käufliches Alkalilignin aus Föhrenholz, Indulin) in lignolytisch aktive Brühe führt zum Abbau dieses Lignins. Der Ligninabbau wird durch die Abnahme der Kulturabsorption bei 280 nm und pH 11 festgestellt.

Zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird unter aeroben Bedingungen in einem Rührkessel (Bioreaktor) gearbeitet, der eine Heizung und einen oder mehrere Turbinenrührer besitzt. Zum Animpfen einer im Reaktor vorgelegten Menge Kulturmedium und zur Probennahme ist der Reaktor mit zwei Schleusen versehen. Mit einer Temperaturregelung wird die Heizung gesteuert, welche die Temperatur im Innern des Reaktors konstant hält. Mit einem pH-Meter wird der pH der Brühe laufend überwacht und gegebenenfalls mit Säure oder Lauge automatisch geregelt. Ferner wird durch eine Leitung Sauerstoff, Luft oder ein anderes sauerstoffhaltiges Gasgemisch in einer zur Erhaltung aerober Bedingungen ausreichender Menge eingespiert.

Während der Kultivierung wird konstant so gerührt, dass sich die Zellfäden ballen und Pellets bilden. Die Pelletbildung ist für das erfindungsgemässe Verfahren wesentlich. Zu hohe Rührerumlaufgeschwindigkeiten führen dazu, dass Pelletbildung verhindert wird oder ein erheblicher Teil der Pellets zerbricht oder zerfasert wird. Hierzu sind an sich übliche Rührer mit relativ niedrigen Rührerspitzen Geschwindigkeiten von 0,5 bis 1,0 ms⁻¹ geeignet. Eine abschliessende Definition von Rührbedingungen und Kinetik ist praktisch nicht möglich, doch kann die Optimierung im Rahmen der oben angegebenen Grenze zwischen Ballen der Zellfäden und Zerstörung der Pellets bei einem gegebenen Pilzmaterial leicht anhand von wenigen einfachen Versuchen ermittelt werden.

Zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens kann, abgesehen von den nachfolgenden erläuterten speziellen Bedingungen, unter den für die erwähnten Mikroben geeigneten allgemeinen Kulturbedingungen (Temperatur, pH-Wert, essentielle Wachstumskomponenten) gearbeitet werden. Beispielsweise ist ein Temperaturbereich von 25 bis 40 °C für die Kultivierung geeignet und ein solcher von 35 bis 38 °C bevorzugt. Der pH-Wert des Mediums liegt allgemein zwischen 3,5 und 6,5 und vorzugsweise zwischen 4 und 5.

Das Medium für die Züchtung der Pellets kann die übli-

chen Quellen für Kohlenstoff (einfache Kohlenhydrate, wie Zucker, z.B. Glucose, Fructose, polymere Kohlenhydrate, z.B. Stärke, Cellulose, Glucane oder Salze organischer Säuren, wie Acetate, Succinate, Tartrate usw.) und Stickstoff (Ammoniumsalze, Nitrate oder komplexe organische Stickstoffverbindungen) sowie Vitamine (Thiamin ist meistens ausreichend) und Mineralstoffe wie Fe, Mg, Ca, und Spurenelemente wie Mn, Co, Zn, Cu (Netz Wasser ist meistens ausreichend). Die Menge der Mediumszutaten soll so gewählt werden, dass das Wachstum durch einen oder mehrere essentielle Wachstumsstoffe vorzugsweise Kohlenstoff beschränkt wird und die restlichen Zutaten im Überschuss vorhanden sind. Der Anteil eines Wachstumsstoffes am Kulturmedium wird dann als limitierend bezeichnet, wenn eine Verminderung des Anteils des Wachstumsstoffes am Kulturmedium zu einer merklichen Abnahme der Biomassenproduktion führt. Eine solche Verarmung bzw. Limitierung der essentiellen Wachstumsstoffe hat zur Folge, dass sich das Pilzmaterial praktisch nicht mehr vermehrt, was zu einer lignolytischen Aktivierung der Brühe führt.

Wesentlich für das erfindungsgemässe Verfahren ist es, dass das Medium eine oder mehrere zellwandstabilisierende Substanzen wie Polyethylenglycol und/oder Polypropylen-glycol aber auch Kohlenwasserstoffe enthält. Die Untersuchungen zur Abklärung der Wirkungsweise der erfindungsgemäss geeigneten Substanzen auf die Aktivierung der Brühe sind nicht abgeschlossen. Ähnliche Effekte werden durch Zugabe von Detergentien wie Tween oder Oleinsäure erreicht. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichungen von Asther, M., Corrieu, G., Drapron, R. und Odier, E. (1987) Enzym Microb. Technol. 9, 245–249 und von Jäger, A., Croan, S. und Kirk, T.K. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 50, 1274–1278 verwiesen.

Die aktive Brühe kann als solche z.B. für den Abbau von Ligninen in ligninhaltigen Substanzen oder von persistenten Schadstoffen verwendet werden; oder sie kann in bekannter Weise durch Zentrifugieren und/oder Filtration für die Herstellung eines Enzympräparates mit lignolytischer Aktivität aufgearbeitet werden. Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Produktion von lignolytischer Brühe unter Zugabe von Polypropylenglycol

Der Stamm *Phanerochaete chrysosporium*, mit der Hinterlegungsnummer ATCC 24725, wurde auf 40 ml 2% Maltagar in 300-ml-Erlenmeierkolben für 4 Tage oder länger bei 37 °C bis zur vollständigen Sporulierung (Agarfläche zugedeckt mit weissen Sporen) kultiviert. Die Sporen wurden in 30 ml sterilem Wasser suspendiert und ihre Anzahl mikroskopisch festgestellt. Die Sporensuspension wurde für die Impfung des Reaktors gebraucht.

Zur Einleitung des erfindungsgemässen Verfahrens wurde ein mechanisch gerührter Reaktor mit zwei sechsblättrigen Scheibenrührern und vier Strömungsbrechern (baffels) verwendet. Skizze dieses Rührkesselreaktors, Zusammenstellung der Abmessungen vom Gefäss, Einbauten, Rühr- und Begasungseinrichtungen sowie einige kennzeichnende geometrische Kenngrössen sind in Fig. 1 angegeben. Die Belüftung erfolgte jeweils mittels eines Gasverteilungsringes unterhalb der niedersten Röhreinheit. Der Reaktor hatte vier Strömungsbrecher, und sein Gesamtvolumen betrug 0,042 m³. Der Reaktor war auf ein maximales Füllvolumen von 0,03 m³ ausgelegt. Der Reaktor wurde mit 30 l frischem Kulturmedium, das die in der folgenden Tabelle angegebene Zusammensetzung hat, versetzt und dessen pH-Wert mit Phosphorsäure auf 4,5 eingestellt und bei 121 °C während 20 min sterilisiert.

Tabelle 1

Komponente	Konzentration (Liter) ⁻¹
Glucose	3 g
Diammoniumtartrat	0,66 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	30 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5,55 mg
Thiamin	100 mg
Leitungswasser	Rest

Nach der Sterilisierung des Reaktors wurde der Rührer auf 150 ± 20 U/min eingestellt, die Temperatur des Mediums auf 37 ± 2 °C gebracht und mit der Temperaturregelung auf diesem Wert gehalten. Der pH-Wert betrug $4,5 \pm 0,2$ und wurde laufend von der pH-Regelung überwacht. Der für die Züchtung benötigte pH-Wert wurde mit 16%iger NaOH und 20%iger H₂SO₄ eingestellt.

Danach wurde das Kulturmedium mit der vorbereiteten Sporensuspension ($7 \cdot 10^6$ Sporen l⁻¹) inokuliert und mit geschlossenem Abzugsventil bei der angegebenen Temperatur gehalten und unter fortlaufender Frischluftzuführung (volumenbezogener Gasdurchsatz von 0,1 l Luft pro l Flüssigkeit pro min) durch die Belüftungsleitung und Luftableitung aerob gehalten. Gelegentlich wurden 100 ml Probe durch das Abzugsventil des Reaktors aus dem Kulturmedium entnommen, durch einen tarierten Papierfilter filtriert und die Glucosekonzentration im Filtrat gemessen. Die Bestimmung des Glucosegehaltes wurde in einem automatischen Analysator (YSI-Instruments, USA) durchgeführt. Die auf dem Filter zurückgebliebene Biomasse wurde bei 80 °C getrocknet und ausgewogen.

Nach einer kurzen Verzögerungsphase (Lagphase) von einem Tag sank die Glucosekonzentration in der Kultur, und die Biotrockenmasse nahm gleichzeitig zu. Ein Tag nach dem Inokulieren erschienen die Pilze in Form kleiner Pellets, welche sich im Verlaufe des Versuches bis am 4. Tag zu einer

4

Grösse von 3 bis 4 mm entwickelten. Die Glucose war nach 6 Tagen vollständig verbraucht. Ein bis zwei Tage danach konnte die Ligninase im Kulturfiltrat nachgewiesen werden, die in 5 Tagen eine Aktivität von 46 bis 62 U l⁻¹ erreichte.

5

Beispiel 2

Produktion von lignolytischer Brühe und die Entfärbung von Remazolblau

Phanerochaete chrysosporium wurde wie in Beispiel 1 gezüchtet. Nach dem vollständigen Verbrauch von Glucose wurden 3 mg l⁻¹ Remazolblau ins Kulturmedium zugegeben. Die blaue Farbe des Remazols verschwand innerhalb von 1 bis 2 Tagen.

15 Beispiel 3

Produktion lignolytischer Brühe und Ligninabbau

Es wurde wie in Beispiel 1 gearbeitet, jedoch unter Zugabe von 0,1 g l⁻¹ Föhrenholzignin aus der Sulfatkochung (Westvaco Co., Charleston, S.C., USA) gearbeitet. Es wurde 20 70 bis 80% vom Lignin innerhalb von 2 bis 3 Tagen abgebaut.

Beispiel 4

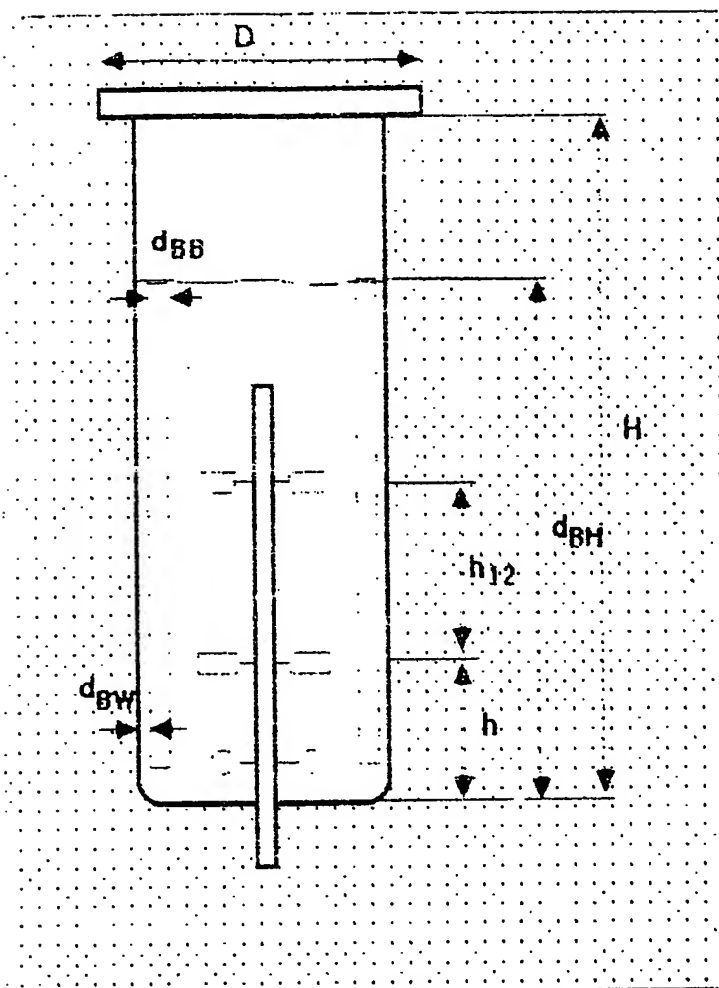
Produktion von lignolytischer Brühe unter Zugabe von Polyethylenglycol

25 Es wurde wie in Beispiel 1 gearbeitet, jedoch unter Verwendung von Polyethylenglycol in gleicher Menge wie Polypropylenglycol. Ein bis zwei Tage nach dem vollständigen Glucoseverbrauch wurde die Brühe lignolytisch aktiv, und die Ligninase erreichte eine Aktivität von 102 bis 106 U l⁻¹ 5 bis 6 30 Tage.

Beispiel 5

Produktion von lignolytischer Brühe unter Zugabe von Hexadecan

35 Es wurde wie in Beispiel 1 gearbeitet, jedoch unter Verwendung von Hexadecan in gleicher Menge wie Polypropylenglycol. Ein bis zwei Tage nach dem vollständigen Abbau von Glucose verschwand die blaue Farbe vom Remazol, und es wurde eine Ligninaseaktivität von 10 bis 20 U l⁻¹ erreicht.



H	792 mm
D	261 mm
h	100 mm
d	89 mm
$h_{1/2}$	240 mm
d_{RB}	22 mm
d_{RH}	18 mm
d_{BH}	581 mm
d_{BB}	30 mm
d_{BW}	5 mm
d_p	3 mm

H / D	=	3.0
D / d	=	2.9
h / d	=	1.1

